

Numération bactérienne en épifluorescence par la méthode couplée DAPI-INT : application à un cas concret

Bacterial enumeration with the DAPI-INT coupled method: application to a concrete case

J. P. Rebillard et M. Torre

Volume 6, numéro 2, 1993

URI : <https://id.erudit.org/iderudit/705171ar>

DOI : <https://doi.org/10.7202/705171ar>

[Aller au sommaire du numéro](#)

Éditeur(s)

Université du Québec - INRS-Eau, Terre et Environnement (INRS-ETE)

ISSN

0992-7158 (imprimé)

1718-8598 (numérique)

[Découvrir la revue](#)

Citer cet article

Rebillard, J. P. & Torre, M. (1993). Numération bactérienne en épifluorescence par la méthode couplée DAPI-INT : application à un cas concret. *Revue des sciences de l'eau / Journal of Water Science*, 6(2), 153–174.
<https://doi.org/10.7202/705171ar>

Résumé de l'article

Un protocole simple de coloration par la méthode couplée DAPI-INT en microscopie à épifluorescence, associé à une lecture des préparations par caméra et vidéo-Imprimante, permet la mesure de paramètres biologiques impliqués directement dans les processus de dégradation de la matière organique en rivière : numérations de microflore totale, nombre de cellules physiologiquement actives (réduisant l'INT), nombre de cellules avec réserves de PHB, dimensions cellulaires et répartition en classes de taille aboutissant à l'évaluation de la biomasse carbonée.

Tous les comptages et mesures sont réalisés à partir de clichés d'imprimante thermique, ce qui assure une reproductibilité et une comparaison entre échantillons plus objective qu'à partir de seules observations directes.

Cette méthode permet de différer soit les comptages (échantillons fixés au formol après incubation à l'INT), soit surtout les mesures de dimensions cellulaires (archivage des clichés pour une exploitation ultérieure). Son application au cas de la rivière Charente montre une évolution particulière de la biomasse bactérienne en aval des rejets de l'agglomération d'Angoulême. La mise en évidence de cellules de grande taille (biovolume moyen de $0,3 \mu\text{m}^3$) et d'une population plus active pourrait traduire une modification physiologique de micro-organismes autochtones réagissant à des conditions de milieu particulières (rejets d'effluents carencés en azote).

Numération bactérienne en épifluorescence par la méthode couplée DAPI-INT : application à un cas concret

Bacterial enumeration with the DAPI-INT coupled method: application to a concrete case

J.P. REBILLARD¹, M. TORRE²

Reçu le 7 septembre 1992, accepté pour publication le 5 février 1993*.

SUMMARY

The increasing appreciation of heterotrophic bacterioplankton as an important and dynamic compartment in the carbon cycle of aquatic ecosystems has led to the development of methods allowing reproducible and reliable direct bacterial counts. Thus, since the 1970's, enumeration of bacteria by epifluorescence microscopy has become a widely used method for the estimation of cell number and biovolume. Cell counts are made using either the acridine orange (Hobbie et al. 1977) or the DAPI (Porter 1980) procedure on fixed samples. A tracer of cellular respiratory activity (INT) can be linked to either of these two methods before the samples are killed by formalin. Two observations of the same field, one in transmitted light, the other by epifluorescence, allow a determination of the percentage of active bacterioplankton (Tabor and Neihof 1982, Dufour 1990).

However, the various authors working with these procedures have modified the protocol and up to now there has not been a standard method. Thus, before using it for the first time, numerous verifications about filters, concentration of dye solution and methods for estimating cell volume are necessary.

In this study a simultaneous comparison, between three brands of filters, two dye solutions and three methods for numeration and cell volume estimation (by direct count, by photographs and by video graphic printer) has been performed.

All the tests have been done with samples collected from rivers or lakes. In comparison to laboratory cultures, natural bacteria are observed with difficulty on account of their small size and especially because natural organic matter absorbs dye solution and so interferes with counts. We prefer to use DAPI rather than acridine

1. Agence de l'Eau ADOUR-GARONNE, 90, rue du Férétra, F 31078 Toulouse Cedex.

2. CEMAGREF, Groupement de Bordeaux, Division Qualité des Eaux, BP 3, F 33610 Gazinet.

* Les commentaires seront reçus jusqu'au 21 décembre 1993.

orange, because DAPI is colorless in direct light, so it doesn't interfere with enumeration of respiring bacteria (red crystal inside cell). To obtain the best contrast for observation in epifluorescence microscopy, a very fast drying in the open air and a structure less troublesome for the observation in direct light, we have chosen Millipore black filters. A camera associated with a video printer gives better results compared to the photographs : no fluorescent "halo" around the cell image and no waste of time waiting for development of the film. All counts and measures were made from video graphic printer photographs, which assures reproducibility and more objective comparisons between samples, compared to direct counts (with eyes) that are tiring and subjective. Finally, we can defer counting (samples fixed in formol after INT incubation) or cell size measurements (analysis of recorded photos) to a later time.

On the basis of this tests, the DAPI-INT method in fluorescence microscopy, associated with the reading of slides with a camera and a video-printer, allows one to measure biological parameters directly implicated in the degradation of river organic matter : abundance of total microflora, number of physiologically active cells (reducing INT) and cells with PHB reserves, cell sizes and size range distribution used to evaluate carbon biomass.

The application of this method to the river Charente (April to November 1991) shows a particular fate of bacterial biomass downstream from the city of Angoulême. A multifactor analysis of variance with a multiple range analysis (Tukey) shows that bacterial cells collected downstream from the effluent discharge of the Angoulême wastewater treatment plant are the largest (average cell volume up to $0.3 \mu\text{m}^3$) and the more active cells. Similar trends have also been observed by Servais and Garnier (1989) downstream from the Paris wastewater treatment plant (Achères) on the Seine river. These authors suggested that allochthonous populations associated with the urban sewage were different from the autochthonous populations (higher biovolume). To verify this hypothesis, a sampling campaign (June 92) was performed on five stations along an eight kilometers river reach. There weren't large size bacteria downstream from the effluent discharge of Frégeneuil, Fléac and St Michel wastewater treatment plants. We found the largest bacteria at Nersac. Thus it seems that these large bacteria don't come from wastewater treatment plant. The increase of autochthonous bacterial size could be interpreted as a nutritional stress, the increase of the C/N ratio preventing cellular division (nitrogen deficient sewages).

Key-words : *methodology, fluorescence, bacterial activity, DAPI, INT, biomass, conversion factors.*

RÉSUMÉ

Un protocole simple de coloration par la méthode couplée DAPI-INT en microscopie à épifluorescence, associé à une lecture des préparations par caméra et vidéo-imprimante, permet la mesure de paramètres biologiques impliqués directement dans les processus de dégradation de la matière organique en rivière : numérations de microflore totale, nombre de cellules physiologiquement actives (réduisant l'INT), nombre de cellules avec réserves de PHB, dimensions cellulaires et répartition en classes de taille aboutissant à l'évaluation de la biomasse carbonée.

Tous les comptages et mesures sont réalisés à partir de clichés d'imprimante thermique, ce qui assure une reproductibilité et une comparaison entre échantillons plus objective qu'à partir de seules observations directes.

Cette méthode permet de différer soit les comptages (échantillons fixés au formol après incubation à l'INT), soit surtout les mesures de dimensions cellulaires (archivage des clichés pour une exploitation ultérieure).

Son application au cas de la rivière Charente montre une évolution particulière de la biomasse bactérienne en aval des rejets de l'agglomération d'Angoulême. La mise en évidence de cellules de grande taille (biovolume moyen de $0,3 \mu\text{m}^3$) et d'une population plus active pourrait traduire une modification physiologique de micro-organismes autochtones réagissant à des conditions de milieu particulières (rejets d'effluents carencés en azote).

Mots clés : *méthodologie, fluorescence, activité bactérienne, DAPI, INT, biomasse, facteurs de conversion.*

1 - INTRODUCTION

Une technique d'observation et de comptage direct des micro-organismes tend actuellement à se généraliser : la microscopie en épifluorescence. Utilisé depuis 1970, ce mode d'observation en lumière incidente requiert l'emploi de fluorochromes spécifiques des acides nucléiques bactériens. Le complexe ainsi formé est excité en lumière de courte longueur d'onde et réémet une lumière visible dans une longueur d'onde supérieure intense. On peut ainsi mettre en évidence des formes cellulaires particulièrement ténues ($< 0,5 \mu\text{m}$) parmi d'autres particules non biologiques, sans pouvoir toutefois en observer de manière fine la morphologie.

Deux méthodes sont couramment pratiquées selon le fluorochrome utilisé :

- coloration au 4'-6-diamidino-2-phenylindole dihydrochlorure (DAPI),
- coloration au 3,6-tétraméthyl diamino acridine ou Acridine Orange (A.O.)

A l'une ou l'autre de ces deux méthodes peut être couplée l'utilisation d'un révélateur d'activité respiratoire cellulaire, le chlorure de 2-(p-iodophényl)-3-p(nitrophényl)-5 phényl tétrazolium (INT). Un second examen peut donc être pratiqué sur les mêmes champs optiques, mais cette fois en lumière transmise : la présence de cristaux d'INT-formazan révélant les cellules physiologiquement actives.

L'abondante littérature sur ce sujet fait apparaître que chaque auteur adapte plus ou moins la méthode en modifiant certains détails selon ses besoins. Aucun protocole fiable et rapide, proche d'une norme en matière d'observation en épifluorescence, n'émerge de ces nombreuses variantes. Aussi l'utilisateur est-il confronté à un choix éclectique de procédures quant à la préparation de l'échantillon, à la coloration et à l'observation. La brièveté des descriptions des détails des opérations et le manque d'explications pratiques peuvent gêner pour la mise en œuvre de l'une ou l'autre technique. Ceci oblige souvent à des essais fastidieux de vérification et de mise au point.

Nous avons voulu faire le point en allant à l'essentiel. Une méthode de comptage n'a de valeur que si elle peut être pratiquée en routine afin d'assurer une comparaison objective des résultats. Il a donc été envisagé d'élaborer un protocole opératoire simple dérivé de ceux existants avec, en

préalable, des essais de supports de filtration, de colorants et l'adoption d'un système de lecture commode. Toutes les manipulations ont été réalisées sur des prélèvements réels plutôt que sur des cultures : en effet, la taille des micro-organismes des milieux naturels étant inférieure à celle des souches cultivées en laboratoire, on se trouve souvent en limite de résolution lors d'observations en microscopie optique.

La méthode retenue (DAPI-INT) a été appliquée au cas de la rivière Charente sur quatre stations de mesures (40 km de cours d'eau) dont deux encadrent les rejets de l'agglomération d'Angoulême. L'évolution de la biomasse bactérienne a été suivie durant huit mois, d'avril à novembre 1991 sur dix campagnes de terrain. Des mesures complémentaires sur des stations plus rapprochées ont été réalisées en juin 1992.

2 - MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Préparation de l'Échantillon

2.1.1 Eau

Un échantillon moyen d'eau est réalisé par mélange de 9 prélèvements d'un litre effectués sur un profil en travers de rivière (3 points et 3 profondeurs).

Après agitation vigoureuse, on en prélève 10 ml que l'on incube sur place en présence d'INT (cf. § 3). Le récipient (polystyrène cristal, cape rouge, stérile de 70 ml) baigne dans un bac d'eau de rivière à température ambiante et à l'obscurité. On fixe ensuite le prélèvement au formol à 37 % (0,5 ml). Cet échantillon est ensuite conservé à 4°C et à l'obscurité jusqu'à l'acheminement au laboratoire où il est ensuite traité par coloration (cf. § 2 : fluorochromes) dans un délai pouvant aller jusqu'à 15 jours (MAKI et REMSEN, 1981).

2.1.2 Sédiment

Il nécessite une préparation particulière (DEFLAUN et MAYER, 1983, Schallenberg *et al.*, 1989). Un échantillon moyen de sédiment est préparé à partir de trois carottages (carottier automatique CEMAGREF ou tube de Plexiglas de 5 à 7 cm de diamètre) ou de trois prélèvements effectués en plongée. La prise d'échantillons se fait de manière aléatoire en trois points du fond distants d'une dizaine de mètres. Elle ne concerne que la partie superficielle du sédiment, interface d'échange active dont l'épaisseur varie, selon la nature et la texture du sédiment, de quelques millimètres à quelques centimètres.

Dix grammes d'échantillon moyen sont mélangés à 90 ml d'eau de dilution stérile (Ringer) dans un sac plastique stérile de type Bagfilter pour stomacher, refermé à l'aide d'une barrette-clip. Après trituration manuelle, ce sac est conservé à 4°C.

De retour au laboratoire, le traitement mécanique est poursuivi. 10 ml de la solution mère au 1/10 sont prélevés aseptiquement au travers du filtre grossier du Bagfilter. Ils sont soumis aux ultrasons à l'intensité de 125 W pendant deux minutes afin de dissocier les agrégats bactériens.

Après un passage sur filtre en fibre de verre type AP20 (Millipore), le filtrat est recueilli en flacon plastique stérile de 70 ml et traité comme dans le cas d'un échantillon d'eau : incubation à l'INT et fixation au formol, puis dilutions et coloration.

Nous n'avons traité qu'un nombre restreint de prélèvements (trois échantillons moyens). Cette technique permet cependant d'obtenir rapidement des préparations sur lame de qualité correcte sans trop perturber l'échantillon.

2.2 Choix du fluorochrome

Les deux colorants le plus fréquemment employés, l'acridine orange et le DAPI, ont la propriété de se lier aux acides nucléiques bactériens. Leur pénétration cellulaire passive présente l'avantage de pouvoir utiliser des échantillons fixés au formol. Ce mode de conservation pratiqué dès la collecte de l'échantillon moyen sur le terrain assure l'intégrité du prélèvement (aucune évolution) et permet de différer éventuellement la coloration.

2.2.1 Acridine orange

Excitée en lumière bleue (450-490 nm), la liaison A.O.-DNA fluoresce en vert et la liaison A.O.-RNA en rouge-orangé ou jaune.

Concentration et conservation

La solution-mère est dosée à 100 mg / 100 ml. La concentration finale est de 10 % soit 100 µg / ml d'échantillon. Cette solution se conserve à 4°C et à l'obscurité.

Interprétation de la coloration

La fluorescence rouge-orangée ou jaune est interprétée comme un signe de l'activité des cellules : prédominance d'acide nucléiques monocaténares (RNA) ou comme un constat de cellules mortes : présence de DNA monocaténaire. Les cellules métaboliquement inactives, n'opérant pas de synthèse protéique, fluorescent en vert (DNA bicaténaire) (HARVEY et YOUNG, 1980, MAKI et REMSEN, 1981).

2.2.2 DAPI

Excitée en lumière U.V. (340-380 nm), la liaison DAPI-DNA bicaténaire fluoresce en bleu brillant.

Concentration et conservation

PORTER et FEIG (1980) ne constatent aucune différence pour des concentrations de 0,05 à 0,1 µg/ml ainsi que COLEMAN (1980) pour 0,1 à 0,5 µg/ml. Pour

une détection optimale, SIERACKI *et al.* (1985) recommandent 5 µg/ml dans le cas des eaux de même que SCHALLENBERG *et al.* (1989) dans le cas de sédiments. DUFOUR *et al.* (1990) utilisent une solution à 10 µg/ml.

Afin d'assurer la saturation des sites de fixation du colorant et le marquage des plus petites cellules, notre solution-mère est aussi dosée à 10 µg/ml. La concentration finale est ignorée du fait de la technique employée : contact direct colorant-membrane après filtration (cf. § 5 : protocole opératoire). Un rinçage ultérieur élimine l'excès de DAPI.

Une durée d'incubation de 5 mn est suffisante pour avoir une bonne pénétration cellulaire (COLEMAN, 1980).

Des mesures d'absorbance en spectrométrie à 342 nm montrent que la solution-mère ne se dégrade pas après un stockage d'un mois à 4°C et à l'obscurité. Une utilisation quotidienne de la solution de DAPI entraîne 25 % de dégradation du produit actif au bout d'un mois (absorbance passant de 0,854 à 0,642). La conservation de ce produit photosensible sera assurée en flaconnage sombre.

Interprétation de la coloration

La spécificité du DAPI est liée à la présence de séquences de DNA riches en adénine et thymine (double hélice). Ceci ne permet pas de différencier les cellules vivantes des cellules mortes mais non lysées (ADN non dégradé) (COLEMAN, 1980, PORTER et FEIG, 1980). Cette fraction cellulaire morte affecte peu les évaluations de biomasse. La légère surestimation qui s'ensuit peut contrebalancer l'absence de prise en compte de certaines cellules de très petite taille, à peine détectables.

Dans ces longueurs d'onde d'excitation, le DAPI non lié (non éliminé par rinçage) ou lié à du matériel non biologique fluoresce en jaune pâle.

Lié aux granules de polyphosphates (COLEMAN, 1980) et de polyhydroxybutyrates (PHB), il fluoresce en jaune brillant. Les PHB représentent des réserves carbonées cellulaires, accumulées lorsque le carbone du milieu est en excès et lorsque l'azote et l'oxygène sont limitants. De ce fait, la synthèse protéique diminue et le carbone est préférentiellement converti en polymère. Ces réserves seront utilisées dans un milieu pauvre en azote ou en l'absence de carbone exogène. Elles sont présentes chez de nombreuses espèces (*Sphaerotilus*, *Leptothrix*, *Pseudomonas*, *Bacillus*). (MILLS et BELL, 1986).

2.2.3 Avantages et inconvénients des fluorochromes

La liaison de l'A.O. à des particules non biologiques et l'autofluorescence de débris au niveau de la préparation gênent l'observation des cellules bactériennes. Ceci est particulièrement vrai pour les échantillons issus des milieux naturels (petites cellules, présence de matières en suspension).

La nuance entre les couleurs orangée et vert-jaune n'est pas toujours nette. Selon MAKI et REMSEN (1981), les variations dans les couleurs seraient dues au mode de préparation de la lame (concentration et temps de contact du colorant). La coloration observée ne serait donc pas toujours en rapport

avec l'activité bactérienne (QUINN, 1984). A cela s'ajoute l'affaiblissement rapide d'intensité (fading).

Cette liberté dans l'interprétation nous a conduit à préférer l'emploi d'un autre fluorochrome, le DAPI. Ce colorant est photodégradable. Il présente une spécificité vis-à-vis du DNA, une forte intensité de fluorescence et un affaiblissement d'intensité peu marqué. La détection des très petites bactéries peut parfois être gênée par l'intensité de la fluorescence des grosses cellules. Les fluorescences parasites ou indésirables sont limitées et se distinguent nettement. Par exemple, la chlorophylle *a* des phototrophes autofluoresce en rouge (CARON, 1983, SIERACKI *et al.*, 1985). Par ailleurs, le colorant ne pénètre pas les spores des bactéries à Gram positif (COLEMAN, 1980).

2.3 Mesure de l'activité bactérienne

L'utilisation d'un fluorochrome permet le dénombrement de l'ensemble des cellules intactes d'un échantillon. Une part de cette microflore totale est en dormance (ralentissement du métabolisme aux températures hivernales par exemple) (DEFLAUN et MAYER, 1983) ou en état de stress nutritionnel selon les conditions environnementales (KING et PARKER, 1988, DUFOUR *et al.*, 1990).

Pour évaluer la fraction bactérienne active, diverses approches sont utilisées telles que l'étude des synthèses cellulaires, l'incorporation de substrats marqués ou la mesure de la fonctionnalité des systèmes de transport d'électrons (activité ETS) (TABOR et NEIHOF, 1984).

La mise en évidence de l'activité respiratoire bactérienne passe par l'utilisation d'un sel de tétrazolium (BROBERG, 1985, O'CARROLL, 1988). L'INT traverse les parois cellulaires et intervient comme accepteur d'électrons en détournant le flux d'électrons de la chaîne des cytochromes de la cellule active. Seules les cellules vivantes réduisant l'INT (MAKI et REMSEN, 1981), la fixation de l'échantillon au formol se fera après incubation à l'INT.

La durée d'incubation est d'une heure sitôt la prise d'échantillon réalisée (HARVEY et YOUNG, 1980, TABOR et NEIHOF, 1982, QUINN, 1984, DUTTON *et al.*, 1986, DUFOUR *et al.*, 1990).

L'ajout d'un sel de cyanure à la concentration utilisée n'est pas toxique pour les cellules, mais inhibe le dernier transporteur d'électrons de la chaîne respiratoire (la cytochrome-oxydase) et améliore le marquage (WEIL, 1983).

2.3.1 Concentration et conservation du produit.

La solution-mère d'INT est dosée à 0,2 g / 100 ml. La concentration finale est de 0,02 % soit 0,2 mg / ml d'échantillon. Cette solution se conserve à 4°C et à l'obscurité, en flaconnage sombre. La solution de cyanure de potassium (dosée à 1,4 mg CN / l) est utilisée à raison de 1 ml par 10 ml d'échantillon.

2.3.2 Interprétation

L'INT est réduit en formazan qui se présente sous forme de cristaux rouges intracellulaires. On peut trouver plusieurs cristaux par cellule. A l'observation,

les cristaux plus ou moins gros ne sont souvent pas sur le même plan que le contour cellulaire ce qui contraint à modifier fréquemment la mise au point.

Lors du montage de la préparation entre lame et lamelle, le formazan, insoluble dans l'eau, se solubilise progressivement dans l'huile à immersion. Ceci oblige à une lecture rapide et nuit à la conservation des lames (DUFOR *et al.*, 1990).

Si la réduction de l'INT est fonction de l'intensité des processus respiratoires, des cellules peu actives développeront des cristaux trop petits et difficilement détectables ce qui entraînera une sous-estimation de la biomasse active. De même, l'INT-formazan n'est pas décelable sur très petites cellules $< 0,3 \mu\text{m}$ (HARVEY et YOUNG, 1980, MAKI et REMSEN, 1981). Le sel de cyanure favorise la formation de plus gros cristaux (TABOR et NEIHOFF, 1982). A l'opposé et pour des durées d'incubation dépassant une heure, les cristaux peuvent masquer la fluorescence des cellules en encombrant tout le volume cytoplasmique (MAKI et REMSEN, 1981).

2.4 Membranes filtrantes

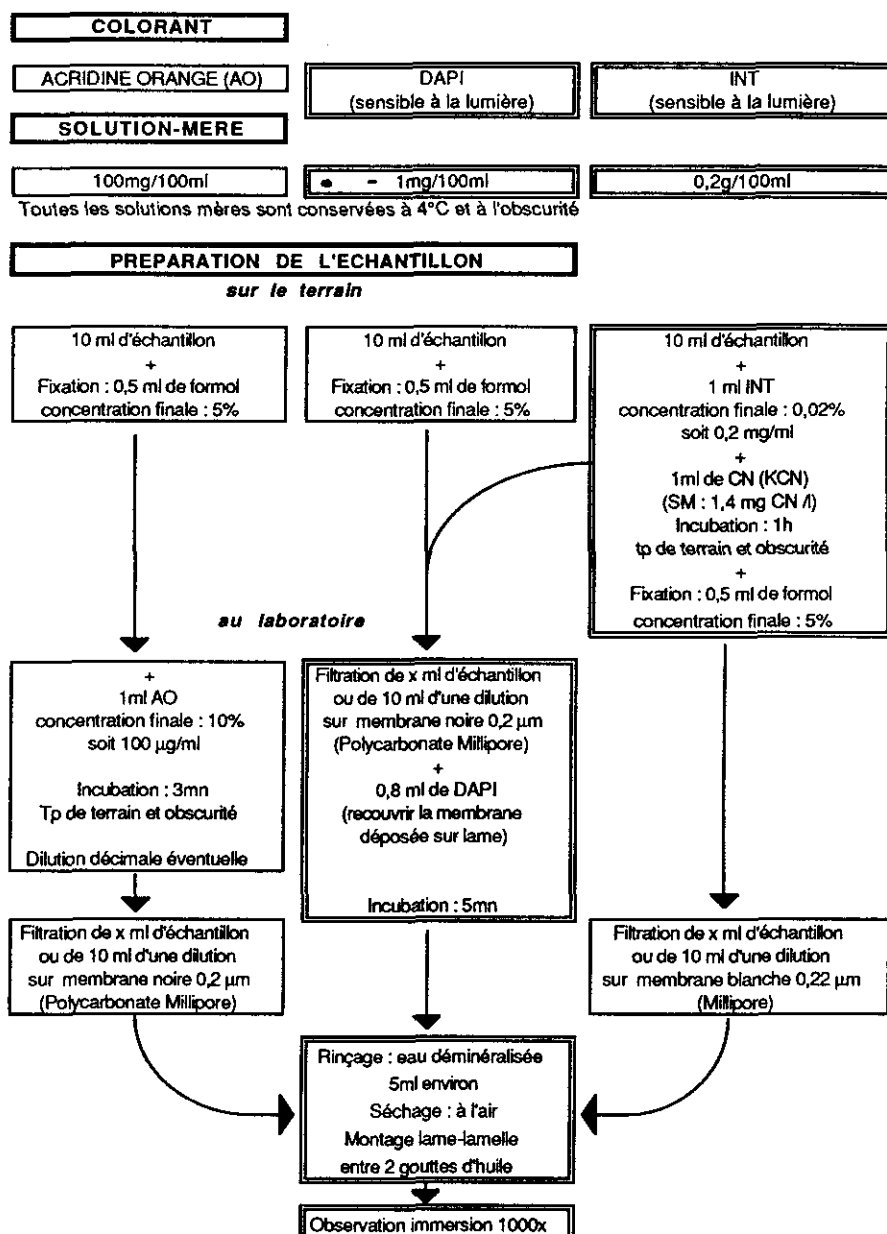
Les échantillons soumis à l'INT sont fixés puis filtrés. Les qualités requises pour une membrane filtrante sont essentiellement de retenir le plus grand nombre de micro-organismes, de présenter une structure la plus uniforme possible, de devenir transparente dans l'huile à immersion lors de l'utilisation en lumière transmise et, enfin, ne pas autofluorescer en lumière réfléchie.

Nous n'avons pas testé les membranes Nucléopore bien que celles-ci soient largement utilisées. Pour des questions de coût, nous avons préféré essayer d'autres produits (Sartorius, Whatman, Millipore). Nous avons choisi des membranes de marque Millipore (diamètre de filtre de 25 mm) qui permettent la double observation en lumière transmise et réfléchie.

Ces membranes en polycarbonates sont soit translucides soit noires. Ce sont les membranes de type « Isopore » noires qui ont été retenues car contrairement aux membranes translucides, elles n'absorbent pas les colorants et offrent un contraste à l'observation en fluorescence avec un fond noir uniforme. Non hygroscopiques, elles séchent rapidement. Le recueil des micro-organismes s'effectue sur une surface plane et lisse. En lumière transmise, leur structure est bien moins gênante que celle des filtres de cellulose.

2.5 Protocole opératoire

Le tableau 1 récapitule l'ensemble des techniques testées. La coloration couplée DAPI-INT a été retenue pour les raisons invoquées précédemment et appliquée à l'étude de la microflore des eaux de la Charente.

Tableau 1 Protocole opératoire des méthodes de coloration utilisées.**Table 1** Flow diagram for the DAPI-INT method.**Note :**

Méthode DAPI-INT en double encadré.

Toutes les solutions employées sont stérilisées par filtration sur membrane de porosité de 0,22 µm.

Lors de la filtration, ajuster la quantité de liquide à 10ml pour assurer une répartition homogène.

Pour l'observation, la membrane est coupée en quatre parties montées séparément.

2.6 Observations microscopiques

2.6.1 Équipement de base

Un microscope Leitz Laborlux S est muni d'un dispositif en lumière réfléchie avec brûleur HBO vapeurs de mercure de 50 W. Un porte-filtre à 3 positions permet l'observation en fluorescence (DAPI ou A.O.) ou en lumière transmise (100 W - 12 V). Les caractéristiques des blocs-filtre sont présentées dans le tableau 2. L'optique comprend un objectif PL Fluotar 100/1.32 immersion à diaphragme et deux oculaires périplan 10X/18. Un variateur de grossissement Leitz permet d'augmenter le grossissement total d'un facteur 1,25, 1,6 ou 2 sans modifier la profondeur de champ.

Tableau 2 Caractéristiques des filtres utilisés.

Table 2 Fluorescence microscopy filters.

	A.O. = BLOC I3	DAPI = BLOC A
Lumière d'excitation	bleue	ultra-violet
Filtre d'excitation	450-490 nm	340-380 nm
Miroir séparateur	510 nm	400 nm
Filtre d'arrêt	520 nm	430 nm

2.6.2 Imagerie

Plusieurs solutions de comptage ont été testées :

- la lecture directe au microscope : on décide d'un nombre de champs à observer qui varie selon la densité cellulaire de l'échantillon et pour lesquels il faut dénombrer et mesurer les cellules. La fatigue oculaire ne permet pas de mener à bien la lecture d'un nombre important d'échantillons.

- les clichés photographiques ou diapositives : nous avons pourvu le microscope d'un système automatique de prise de vue. L'exploitation par projection des diapositives obtenues ne permet pas de mesurer avec précision les cellules, leur contour présentant un halo dû à la fluorescence. L'agrandissement de l'image favorise l'effet de flou. En outre, le délai entre la prise de vue et le tirage des films oblige à multiplier les dilutions de l'échantillon et le nombre de vues afin de s'assurer d'une préparation sur lame représentative et d'un minimum de vues exploitables.

Les manipulations par échantillon doivent être réduites et une lame montée doit être lue et exploitée rapidement. Pour cela, ces deux procédés ne donnent pas satisfaction. Une troisième technique a été retenue pour notre étude :

- le système vidéo : la monture C de la tête trinoculaire reçoit une caméra noir et blanc CCD 0.5 Lux reliée à une unité de contrôle (C2400-77 Hamamatsu). Cette unité permet des corrections de l'image reçue sur moniteur et transmise à une vidéo-imprimante. Ce système est déjà utilisé avec un logiciel d'analyse d'image par PSENNER (1991) et SCHRÖDER et KRAMBECK (1991).

L'obtention de clichés étant instantanée, on peut comparer ce que l'on observe à ce que l'on imprime. L'archivage des clichés permet une exploitation ultérieure.

2.7 Méthode de comptage

2.7.1 Numération

L'observation d'une membrane dans sa totalité est mal aisée car celle-ci se déforme par la chaleur concentrée sur la préparation. Le manque de planéité au niveau du champ observé gêne l'observation et empêche toute prise de vue nette. Après séchage, la membrane est donc coupée en quatre (DUFOUR *et al.*, 1990). Chaque quart est monté entre deux gouttes d'huile à immersion non fluorescente et entre lame et lamelle. L'ensemble est fermement comprimé à l'aide d'une pince.

Sur une même lame et pour chacun des champs, nous effectuons deux vidéo-impressions : une de l'observation en fluorescence (DAPI) et une de l'observation en lumière transmise (INT) en faisant varier la source lumineuse. Ces deux images superposables permettent d'associer les cristaux de formazan à la cellule correspondante observée en fluorescence. Ces cristaux pouvant masquer la fluorescence des petites bactéries, il est ainsi facile de corriger le comptage DAPI.

Pour la calibration de l'image, nous calculons le nombre de champs utiles. Pour une membrane de diamètre de filtration de 2 cm et une aire de champ calibrée au micromètre objet (oculaire 10X, objectif 100X), on détermine le nombre de champs microscopiques observables par membrane. La caméra ne prenant en compte que la partie centrale du champ observé, on calibre de la même manière une aire de champ caméra. On peut ainsi décompter un nombre de champs caméra par membrane, qui seront restitués sur cliché au format 9 x 7 cm en vidéo impression.

D'après TROUSSELIER *et al.* (1985), la distribution des cellules sur une membrane filtrante étant contagieuse plutôt qu'aléatoire, le nombre de champs à dénombrer se détermine donc en fonction du niveau de précision désirée et du nombre moyen de cellules par champ. Nous avons observé 20 champs par membrane soit de 200 à 600 cellules par échantillon. La précision de nos numérations est de l'ordre de 10 %. La lecture de ces 20 champs en utilisant le système vidéo correspond à une exploitation de 0,03 % de la surface de la membrane, alors que par comptage direct, cela concernerait 0,16 % de cette surface.

L'échantillonnage des champs que l'on observe est strictement aléatoire : nous choisissons au hasard 5 champs par quart de membrane, répartis aussi bien vers le centre qu'en périphérie de secteur.

2.7.2 Détermination des volumes cellulaires

La forme retenue pour le calcul des biovolumes est le cylindre à bouts hémisphériques dont la forme limite sera une sphère. Les paramètres morphométriques (L et I) hiérarchisent des volumes cellulaires et non des

formes bactériennes. Ainsi, un coque ou un bacille court pourront avoir un volume identique avec des valeurs de L et l différentes. La mesure (longueur L et largeur l) des cellules bactériennes est réalisée sur clichés à l'aide d'une loupe et de papier millimétré transparent avec la correspondance de 1 mm pour 1 μm . Les biovolumes (V) sont déterminés en appliquant la formule de Bratbak (1985) : $V = (\pi/4) l^2 (L-l/3)$

D'autres formules plus précises faisant intervenir l'aire d'une section et périmètre sont utilisées avec des systèmes d'analyse d'image (SIERACKI *et al.*, 1985, BJORNSEN, 1986).

Pour chacun des échantillons, les cellules qui ne sont repérées qu'à un seul exemplaire pour une taille donnée sont systématiquement éliminées des comptages. En effet, si l'incidence d'une petite ou d'une moyenne cellule est faible dans l'évaluation des biovolumes, il en est autrement pour une cellule unique de grande taille (bactérie filamenteuse) dont la prise en compte modifiera fortement l'estimation d'un volume cellulaire moyen.

Toutes les autres sont comptabilisées, dans un premier temps, en une vingtaine de classes de volumes correspondant à toutes les tailles observées dans nos échantillons, puis réparties en trois grandes classes de volumes (cf. §2.7.3) pour la détermination de la biomasse.

2.7.3 Détermination de la biomasse bactérienne

Dans l'impossibilité de déterminer en laboratoire le contenu carboné des cellules bactériennes pour passer des biovolumes aux biomasses, nous avons utilisé des facteurs de conversion (FC) de la littérature.

Le tableau 3 présente quelques-uns de ces facteurs de conversion. Il en ressort que, selon les auteurs, les coefficients diffèrent en fonction du milieu étudié (milieu marin moins riche en matière organique que les eaux douces et où l'azote est limitant) ou qu'ils gardent une même valeur quelle que soit la taille des cellules ou qu'ils varient selon le volume cellulaire.

D'après LEE et FUHRMAN (1987), le contenu carboné par unité de volume varie en fonction de la taille de la cellule et, en proportion, une petite cellule contient plus de carbone qu'une cellule de grande taille. Les facteurs établis par SIMON et AZAM (1989) semblent les mieux adaptés et les plus aptes à être transposés à nos mesures de biovolumes. Dans un souci de cohérence et pour éviter toute extrapolation de leurs données, nous avons retenu 3 classes de volumes dans lesquelles sont rangées toutes nos valeurs, avec, pour chacune, un facteur de conversion (tableau 4). La gamme de biovolumes de nos échantillons s'étage de 0,014 μm^3 à 1,3 μm^3 . Les bornes inférieure et supérieure sont donc reprises des données de SIMON et AZAM (1989). Pour la classe intermédiaire, en considérant une répartition des volumes cellulaires uniforme, nous avons recalculé un FC moyen (17,8 fg de C pour 0,065 μm^3 et 50,5 fg de C pour 0,369 μm^3 soit en moyenne 34,2 fg de C pour 0,217 μm^3).

Tableau 3 Facteurs de conversion exprimés en contenu carboné cellulaire.**Table 3** Carbon conversion factors.

Méthode	Volume μm^3 *	Contenu pg de C/ μm^3 *	Milieu	Référence
Microscope à épifluorescence CDOA (Comptage direct Orange d'Acridine)				
Micromètre oculaire	0,11 - (0,36) - 0,66	0,26 - (0,58) - 0,8		BRATBAK
Photographies	0,19 - (0,47) - 0,71	0,24 - (0,42) - 0,58	Eau de mer	1985
S.E.M. (Scanning Electron Microscopy)	0,14 - (0,29) - 0,39	0,42 - (0,68) - 0,93		
Microscope à épifluorescence CDOA	0,19 - (0,27) - 0,34 0,8 - (0,10) - 0,11	0,18 - (0,31) - 0,43 0,31 - (0,41) - 0,73	Eau douce Eau de mer	BJØRNSSEN 1986
Analyse d'image				
Microscope à épifluorescence CDOA	0,13 - (0,16) - 0,2	0,038 - (0,16) - 0,187	Eau douce	NAGATA 1986
Micromètre oculaire				
Microscope à épifluorescence CDOA	0,036 - (0,056) - 0,073	contenu cellulaire moyen de 0,020 pgC qqs le VCM	Eau de mer	LEE & FUHRMAN 1987
Photographies				
Microscope à épifluorescence CDOA	0,015 - (?) - 0,072	0,059 - (0,154) - 0,207	Eau douce	SCAVIA 1987
Photographies				
	? - (0,026) - ?	? - (0,4) - ?	Eau de mer	SIMON & AZAM 1989
	? - (0,036) - ?	? - (0,35) - ?		
Microscope à épifluorescence CDOA	? - (0,05) - ?	? - (0,304) - ?		
	? - (0,07) - ?	? - (0,267) - ?		
Photographies	? - (0,1) - ?	? - (0,233) - ?		
	? - (0,2) - ?	? - (0,175) - ?		
	? - (0,4) - ?	? - (0,133) - ?		
Microscope à épifluorescence CDOA	0,17 - (?) - 1,8	? - (0,136) - ?	Eau douce	NAGATA 1990
Photographies				

* volume minimum (moyenne) - maximum.

Tableau 4 Contenu carboné moyen pour 3 classes de volumes cellulaires.**Table 4** Average carbon cell content in three cell volume ranges.

Classe	I	II	III
Volume μm^3	< 0,065	0,065 - 0,369	> 0,400
pg C / μm^3 (FC)	0,400	0,158	0,133

2.8 Site d'application

La méthode précédemment décrite a été utilisée pour évaluer la biomasse et l'activité bactérienne des eaux de la rivière Charente. Le site d'étude (*fig. 1*) est un tronçon de 40 km de rivière avec quatre stations de mesure : Angoulême amont : station de référence (ANG), Nersac : 3 km après l'ensemble des rejets d'Angoulême (NER), Châteauneuf : 16 km en aval des rejets (CTN) et Gondeville : 30 km en aval des rejets (GDV). En chacun de ces points, des échantillons moyens d'eau ont été prélevés à des fins de comptages toutes les trois semaines durant huit mois. Des mesures complémentaires sur un secteur de 10 km plus proche de l'agglomération d'Angoulême ont été réalisées en juin 1992.

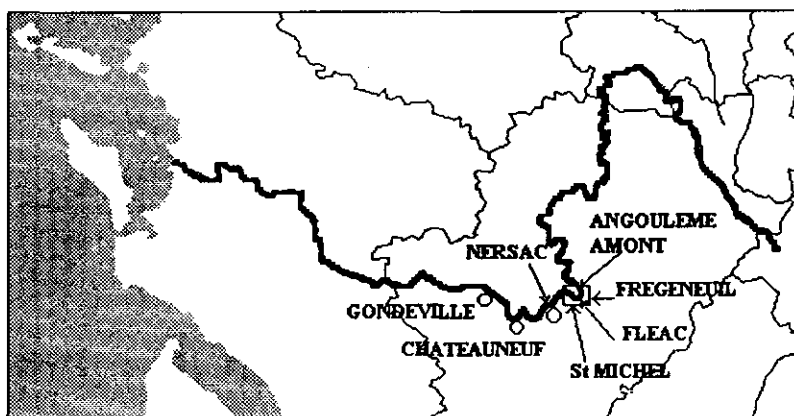


Figure 1 Localisation des sites d'échantillonnage sur la rivière Charente.
Localisation of sampling stations on Charente river.

3 - RÉSULTATS - DISCUSSION : Cas de la rivière Charente

L'impact des rejets de l'agglomération d'Angoulême (effluents urbains et industriels, micro-organismes allochtones) sur la Charente peut être abordé par l'étude de sa microflore bactérienne hétérotrophe.

Pour illustrer de façon synthétique l'ensemble de notre démarche expérimentale, nous prendrons un exemple des mesures réalisées lors d'une campagne de terrain en septembre 1991 sur chacune des stations. Les cellules observées sont comptées, mesurées et réparties selon des classes de volumes réelles (*tableau 5*). Ces données sont ensuite regroupées selon les trois classes précédemment définies (*tableau 4*). Nous pouvons alors évaluer un contenu cellulaire carboné moyen (*tableau 6*). Ainsi, la méthode couplée DAPI-INT appliquée à nos échantillons renseigne sur les caractéristiques de la microflore bactérienne sur un secteur de la Charente (*tableau 7*).

Tableau 5 Dénombrements et volumes cellulaires (observation de 20 champs par lame).

Table 5 *Bacterial cell numbers and total cell volumes ordered by increasing volume.*

V.I. en μm^3 *	0,014	0,065	0,124	0,164	0,262	0,268	0,360	0,369	0,458	0,524	0,620	1,309
ANG												
nb**	50	16	15	20		10		4		8	3	
vt***	0,71	1,05	1,86	3,27		2,68		1,47		4,19	1,86	
NER												
nb	24	68	30	42		42	2	2		46	6	22
vt	0,34	4,45	3,73	6,87		11,26	0,72	0,74		24,09	3,72	28,80
CTN												
nb	24	40	16	36	2	28	6		2	12		
vt	0,34	2,62	1,99	5,89	0,52	7,51	2,16		0,92	6,28		
GDV												
nb	23	50	27	10		27		2		6		
vt	0,32	3,27	3,36	1,64		7,24		0,74		3,14		

* volume cellulaire individuel. ** nombre de cellules. *** volume total par classe.

Tableau 6 Répartition des données en 3 classes de volume et contenu cellulaire carboné moyen.

Table 6 *Breakdown of the data by volume classes and average carbon cell content.*

		Classe I	II	III	pg C/cell.
ANG	nb	50	65	11	
	vt	0,71	10,34	6,05	0,022
NER	nb	24	186	74	
	vt	0,34	27,77	56,60	0,042
CTN	nb	24	128	14	
	vt	0,34	20,69	7,20	0,026
GDV	nb	23	116	6	
	vt	0,32	16,24	3,14	0,021

Tableau 7 Evolution de la microflore bactérienne sur 40 km de cours de la rivière Charente (septembre 1991).

Table 7 *Bacterial evolution along 40 kms of the Charente river.*

	Volume cellulaire moyen en μm^3	% cellules actives	Nb de cellules * 10^6 par ml	Vol. biomasse μm^3 * 10^6 par ml	ng Carbone par ml
ANG	0,14	36	1,29	0,176	28
NER	0,30	60	9,53	2,844	405
CTN	0,17	30	1,56	0,265	41
GDV	0,14	25	1,70	0,232	37

D'une durée de huit mois, l'étude des modifications spatio-temporelles de quelques-uns des paramètres biologiques (numérations totales, activité bactérienne et volume cellulaire moyen) conduit à émettre certaines hypothèses sur la dynamique bactérienne et le fonctionnement de l'écosystème. Les populations bactériennes des rejets de stations de traitement d'eaux usées entrent vraisemblablement en concurrence avec les populations autochtones pour la dégradation de la matière organique apportée à la rivière. Une microflore métaboliquement adaptée à la dégradation de certains substrats, rejetée dans le milieu naturel, se mêle à une microflore qui, elle, sera sensible à un déséquilibre nutritionnel. • Peut-on dissocier ces deux populations ? Quel critère permettrait de les identifier ?

SERVAIS et GARNIER (1990) mettent en évidence, à l'aval immédiat des rejets urbains d'Achères dans la Seine, des bactéries dont le biovolume moyen est de $0,2 \mu\text{m}^3$ soit trois fois plus élevé que celui observé en amont et en aval du secteur étudié. Cette population dite allochtone se distingue par des critères morphologique (biovolume supérieur) et physiologique (vitesse élevée d'incorporation de leucine mesurant l'accroissement de la biomasse).

Les volumes cellulaires moyens (VCM) sont voisins pour la station amont et celle située le plus en aval (*figure 2*). L'augmentation du VCM constatée à la station de Nersac semble être due aux rejets de l'agglomération d'Angoulême : elle paraît inversement corrélée aux débits d'étiage qui favorisent l'enrichissement des eaux en matières organiques (effluents d'industries papières) (*figure 3*).

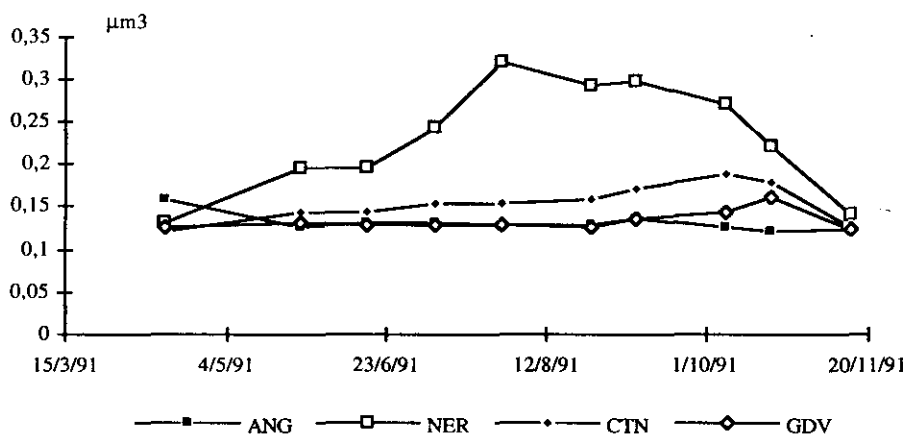


Figure 2 Evolution des volumes cellulaires moyens en fonction du temps pour les quatre sites

Average cell volume evolution for the four sites as a function of time

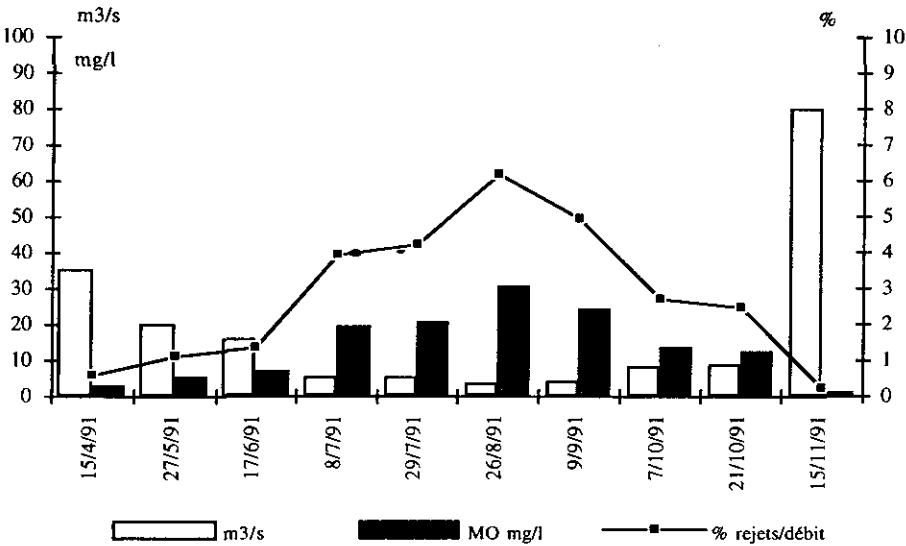


Figure 3 Débits et concentrations en matière organique (MO) moyens de la Charente à Angoulême.
Part des rejets de l'agglomération
*Flow and organic matter concentration of the Charente river at Angoulême.
Fraction flow from town*

Pour tester la variabilité des VCM (40 valeurs) en fonction de l'espace et du temps, nous réalisons une analyse de variance à deux facteurs. Le report des valeurs de F dans une table de Snédécór permet de conclure avec un risque de 5 % que le VCM dépend principalement du lieu de prélèvement et n'est pas influencé par la période de prélèvement (*tableau 8*). Pour apprécier une différence statistique entre les stations, nous effectuons cette fois le test de rang de Tukey qui montre que la station de Nersac diffère des autres. Les VCM mesurés à Nersac sont significativement différents, au seuil de 5 %, de ceux des trois autres sites (*tableau 9*).

Tableau 8 Résultat de l'analyse de variance testant la relation entre VCM au niveau des quatre stations.

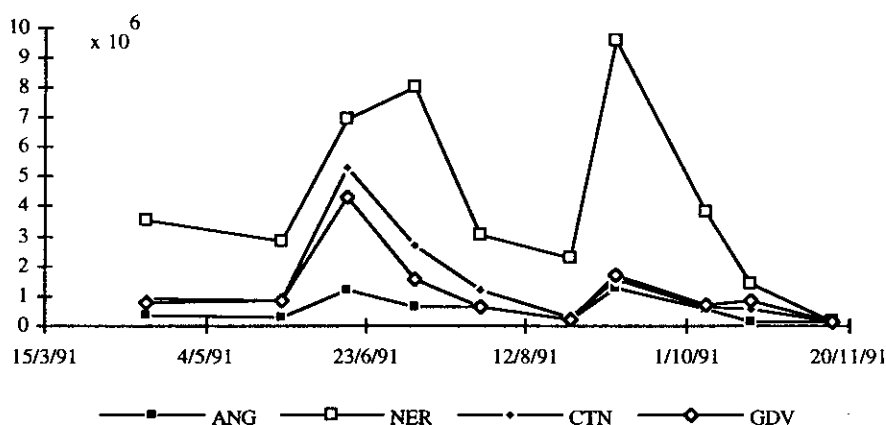
Table 8 ANOVA result testing connection between average cell volumes at the four sites.

Source de variation	Dispersion	ddl	Variance	F
Temps	0,15278	9	0,00169	1,587
Station	0,06608	3	0,02202	20,598
Résiduelle	0,02887	27	0,00106	-
Total	0,11024	39	-	-

Tableau 9 Résultat du test de rang de Tukey.**Table 9** Tukey test result showing sites difference.

	N	Moyenne	Groupes homogènes
Angoulême	10	0,1314	*
Gondreville	10	0,1330	*
Châteauneuf	10	0,1536	*
Nersac	10	0,2310	

L'augmentation du nombre de microorganismes à Nersac peut correspondre au mélange de deux populations bactériennes, celle de la rivière et celle des rejets dont l'abondance peut être liée à la moindre dilution des apports aux débits d'étiage (figure 4). Les numérations plus faibles de juillet et août 1991 seraient sans doute à relier à la fermeture estivale de certaines entreprises. La proportion de cellules actives est plus importante sur le site de Nersac qu'ailleurs (figure 5).

**Figure 4** Evolution du nombre de cellules en fonction du temps pour les quatre sites

Changes in cell number evolution at the four sites as a function of time

A ce stade, nous ne pouvons pas déterminer l'origine de ces cellules de grande taille. Si un VCM élevé caractérise les cellules allochtones, nous devrions trouver de grosses cellules à l'aval immédiat de la station de Frégeneuil ou de celle de Fléac, ce qui n'est pas le cas. En effet, des mesures effectuées en juin 1992 sur un tronçon de 10 km de rivière Charente montrent à nouveau le caractère particulier de la station de Nersac. L'activité bactérienne et les réserves carbonées semblent liées à la qualité des apports (tableau 10). Cette activité s'accroît à partir de Saint Michel et le taux de

réserves carbonées cellulaires (PHB) s'élève nettement du fait de rejets d'industries papetières. Le VCM augmente, signalant plutôt une carence nutritionnelle. Ce phénomène est également observable quelques kilomètres en aval, à Nersac où un profil vertical traduit en plus l'hétérogénéité de la tranche d'eau : les microorganismes des couches d'eau superficielles ont un VCM plus élevé, sont plus actifs et accumulent encore des PHB. L'analyse des prélèvements de fond est biaisée par la remise en suspension de dépôts.

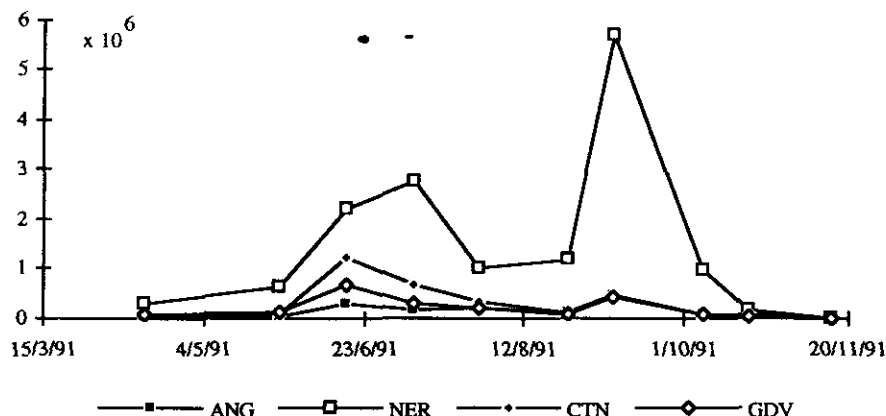


Figure 5 Evolution du nombre de cellules actives en fonction du temps pour les quatre sites
Active cell number at the four sites as a function of time

Tableau 10 Evolution de la microflore bactérienne entre Angoulême et Nersac (juin 1992).

Table 10 Bacterial evolution between Angoulême and Nersac (june 1992).

Stations	germes $\cdot 10^4$ par ml sur gélose	cellules $\cdot 10^6$ par ml DAPI	ng C/ml	VCM μm^3	% activité	% PHB
Angoulême amont	1,5	2,1	49	0,15	4	4
Frégeneuil	2,5	2,0	37	0,14	9	3
Fléac	2,4	3,3	63	0,12	8	3
St-Michel	11,0	4,0	125	0,21	18	10
Nersac (surface)	19,0	8,5	330	0,27	22	3
Nersac (- 2 m)	—	8,2	249	0,20	15	1
Nersac (- 3,5 m)	—	9,8	334	0,23	17	1

Le déséquilibre physiologique bactérien semble donc se traduire par l'accroissement du VCM dans un milieu carencé en azote. BROBERG (1985) montre que, dans les sédiments, l'activité bactérienne décroît avec l'augmentation des apports allochtones et du rapport C/N. Le transfert de la pollution

entre Saint Michel et Nersac et sa dilution (tendance au rééquilibrage de la qualité des eaux) entraînent une plus importante activité plusieurs kilomètres après les rejets.

Les observations en fluorescence par utilisation de la méthode couplée INT-DAPI procurent des renseignements directement exploitables : nombre total de cellules, nombre de cellules actives (INT +), nombre de cellules avec réserves de PHB, enfin, dimensions cellulaires et répartition en classes de taille. L'application de ce protocole à l'étude des eaux de surface montre une relative facilité de mise en œuvre. Les échantillons fixés au formol peuvent être stockés, une fois l'incubation à l'INT réalisée. Par la suite, plusieurs séries seront exploitées en une seule séance de microscopie. De même, après observation, l'ensemble des clichés peut être archivé en vue d'une exploitation ultérieure. Cette souplesse d'utilisation permet de traiter un grand nombre d'échantillons. Le gain de temps par rapport à des méthodes de comptage plus traditionnelles (cultures sur gélose, filtration sur membrane et tests biochimiques) est important. Les dénombrements obtenus sont fiables, réalistes et non plus par défaut. On admet généralement que la fraction de bactéries revivifiables, non stressées pouvant se développer sur milieu artificiel (microflore essentiellement aérobie ou facultative) représente 1 % de l'ensemble des cellules effectivement présentes dans les eaux. Par comparaison avec des dénombrements de microflore totale sur gélose nutritive, les comptages directs en épifluorescence sont supérieurs d'un facteur voisin de 100 à ceux pratiqués en boîte de Pétri (tableau 10).

Afin d'améliorer les numérations et d'assurer leur reproductibilité (sous-estimation possible liée à la persistance d'agrégats malgré l'homogénéisation, aux dilutions successives et au prélèvement aléatoire d'une très faible quantité d'échantillon), une bonne préparation de l'échantillon à observer est essentielle. Le problème des floes non dissociés des eaux turbides et des sédiments est en bonne partie résolu par traitement préalable de l'échantillon aux ultrasons avant filtration (DEFLAUN et MAYER, 1983, TROUSSELIER *et al.*, 1985). La filtration d'au moins 10 ml de liquide (échantillon plus eau stérile) contribuera à une meilleure répartition des cellules sur membrane. En ce qui concerne l'activité bactérienne, le repérage des cristaux intracellulaires de formazan en lumière transmise est plus délicat à maîtriser.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- | | |
|---|---|
| BJORNSEN P.K., 1986. Automatic determination of bacterioplankton biomass by image analysis. <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> 51 (6), 1199-1204. | BROBERG A., 1985. A modified method for studies of electron transport system activity in freshwater sediments. <i>Hydrobiologia</i> 120, 181-187. |
| BRATBAK G., 1985. Bacterial biovolume and biomass estimations. <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> 49 (6), 1488-1493. | CARON D.A., 1983. Technique for enumeration of heterotrophic and phototrophic nanoplankton, using epifluorescence micros- |

- copy, and comparison with other procedures. *Appl. Environ. Microbiol.* 46 (2), 491-498.
- COLEMAN A.W., 1980. Enhanced detection of bacteria in natural environments by fluorochrome staining of DNA. *Limnol. Oceanogr.* 25 (5), 948-951.
- DEFLAUN M.F., MAYER L.M., 1983. Relationships between bacteria and grain surfaces in intertidal sediments. *Limnol. Oceanogr.* 28 (5), 873-881.
- DUFOUR P., TORRETON J.-P., COLON, M., 1990. Advantages of distinguishing the active fraction in bacterioplankton assemblages: some examples. *Hydrobiologia.* 207, 295-301.
- DUTTON R.J., BITTON G., KOOPMAN B., 1983. Malachite green-INT (MINT) method for determining active bacteria in sewage. *Appl. Environ. Microbiol.* 46 (6), 1263-1267.
- DUTTON R.J., BITTON G., KOOPMAN B., 1986. Application of a direct microscopic method of the determination of active bacteria in lakes. *Wat. Res.* 20 (11), 1461-1464.
- HARVEY R.W., YOUNG L.Y., 1980. Enumeration of particle-bound and unattached respiring bacteria in the salt marsh environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 40 (1), 156-160.
- HOBBIE J.E., DALEY R.J., JASPER S., 1977. Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 1225-1228.
- KING L.K., PARKER B.C., 1988. A simple, rapid method for enumerating total viable and metabolically active bacteria in ground-water. *Appl. Environ. Microbiol.* 54 (6), 1630-1631.
- LEE S., FUHRMAN J.A., 1987. Relationships between biovolume and biomass of naturally derived marine bacterioplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* 53 (6), 1298-1303.
- MAKI J.S., REMSEN C.C., 1981. Comparison of two direct-count methods for determining metabolizing bacteria in freshwater. *Appl. Environ. Microbiol.* 41 (5), 1132-1138.
- MILLS A.L., BELL P.E., 1986. Determination of individual organisms and their activities in situ. In Robert L. Tate III, *Microbial autecology. A method for environmental studies*, John Wiley and Sons, New Brunswick, New Jersey. 27-60.
- NAGATA T., 1986. Carbon and nitrogen content of natural planktonic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 52 (1), 28-32.
- NAGATA T., WATANABE Y., 1990. Carbon and Nitrogen to Volume Ratios of Bacterioplankton Grown under Different Nutritional Conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (5), 1303-1309.
- O'CARROLL K., 1988. Assessment of bacterial activity. In B. Austin, *Methods in Aquatic Bacteriology*, John Wiley and Sons, Edinburgh. 347-361.
- PORTER K.G., FEIG Y.S., 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* 25 (5), 943-948.
- PSENNER R., 1991. Determination of bacterial cell volumes by image analysis. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 24 (4), 2605-2608.
- QUINN J.P., 1984. The modification and evaluation of some cytochemical techniques for the enumeration of metabolically active heterotroph bacteria in the aquatic environment. *J.A.B.* 57, 51-57.
- SCAVIA D., LAIRD G.A., 1987. Bacterioplankton in lake Michigan: Dynamics, controls, and significance to carbon flux. *Limnol. Oceanogr.* 32 (5), 1017-1033.
- SCHALLENBERG M., KALFF J., RASMUSSEN J.B., 1989. Solutions to problems in enumerating sediment bacteria by direct counts. *Appl. Environ. Microbiol.* 55 (5), 1214-1219.
- SCHRÖDER D., KRAMBECK H.-J., 1991. Advances in digital image analysis of bacterioplankton with epifluorescence microscopy. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 24 (4), 2601-2604.
- SERVAIS P., GARNIER J., 1990. Activité bactérienne hétérotrophe dans la Seine: profils d'incorporation de thymidine et de leucine tritiées. *C.R.Acad. Sci., Paris*, 311, III, 353-360.
- SIERACKI M.E., JOHNSON P.W., SIEBURTH J.M., 1985. Detection, enumeration, and sizing of planktonic bacteria by image-analysed epifluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 49 (4), 799-810.
- SIMON M., AZAM F., 1989. Protein content and protein synthesis rates of planktonic

- marine bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 51, 201-213.
- TABOR P.S., NEIHOF R.A., 1982. Improved method for determination of respiring individual microorganisms in natural waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 43 (6), 1249-1255.
- TABOR P.S., NEIHOF R.A., 1984. Direct determination of activities for microorganisms of Chesapeake Bay populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 48 (5), 1012-1019.
- TROUSSELLIER M., ALBAT M., ANDRE P., BALEUX B., 1985. Dénombrements directs des bactéries dans les milieux aquatiques par microscopie en épifluorescence : distribution et précision des mesures. *Revue Française des Sciences de l'Eau.* 4, 35-49.
- WEIL J.-H., 1983. Energétique biochimique. *Biochimie générale.* Masson ed. 106-145.